

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018651 A1

(51) 国際特許分類: C12N 1/20, 1/21, C12P 21/02

目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010342

(22) 国際出願日: 2003年8月14日 (14.08.2003)

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-239554 2002年8月20日 (20.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三谷 恭雄 (MITANI, Yasuo) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 中島 信孝 (NAKASHIMA, Nobutaka) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 田村 具博 (TAMURA, Tomohiro) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL MICROORGANISM SENSITIVE TO LYSOZYME

(54) 発明の名称: リゾチーム感受性新規微生物

(57) Abstract: It is intended to provide a bacterium belonging to the genus *Rhodococcus* which is sensitive to lysozyme at a low concentration compared with a wild type strain, can be easily lysed and enables the recovery of an expressed recombinant protein. Namely, a mutant microorganism belonging to the genus *Rhodococcus* which has a higher sensitivity to lysozyme than that of a wild type microorganism belonging to the genus *Rhodococcus*.

(57) 要約: 野生型株と比べて低濃度のリゾチームに対して感受性であり、容易に溶菌が可能で、発現させた組換えタンパク質の回収が容易なロドコッカス属細菌の提供。野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物。

WO 2004/018651 A1

明 細 書

リゾチーム感受性新規微生物

技術分野

本発明は、組換えタンパク質の産生に適したロドコッカス属微生物に関する。具体的には、野生型株と比べて低濃度のリゾチームに対して感受性であり、容易に溶菌が可能な変異株に関する。該変異株を用いることにより発現タンパク質の抽出回収を容易に行うことができる。

背景技術

微生物を宿主とした組換えタンパク質の発現に係る技術として、大腸菌を宿主とした発現系が広く一般に利用されている。その理由として、宿主微生物としての安全性が確認されていること、増殖が早いこと、分子生物学的実験操作が十分に確立されていること等を含め実験室における取り扱いが極めて容易であることが挙げられる。その一方で、組換えタンパク質の発現において、大腸菌に見られない有用性、優位性を持つ宿主微生物の開発が進められている。

ロドコッカス属微生物は一部を除き病原性が無く、通常の実験室内で容易に培養が可能であるといった必須条件に加え、産業上極めて有用な微生物触媒としての機能を有しているため、近年様々な分子生物学的技術が開発されている。例えば、該微生物にさらに有用な機能を付加する目的で、遺伝子組換え技術に係る開発が行われ、大腸菌およびロドコッカス属微生物のいずれにおいても自立複製が可能なシャトルベクターが確立されている (R. De Mot et al., Microbiology 143, 3137-3147 (1997))。また、ロドコッカス属微生物においては転移可能なトランスポゾンの存在も報告されており (I. Nagy et al., J. Bacteriol. 179, 4635-4638 (1997)) 遺伝子破壊や染色体への外来遺伝子の組み込み等による該微生物の機能改良が期待される。

こうした分子生物学的基盤の確立の上に、微生物触媒としての機能をさらに高めることを目的として、組換えタンパク質の発現のためのベクターの開発が行わ

れている（特開平 10-248578）。

ロドコッカス属微生物であるロドコッカス・エリスロポリスは微生物触媒としての有用性に加えて、4℃という低温環境下での増殖が可能であるという際だった特徴を有する。それゆえ、これまでには確立されていなかった、大腸菌等を用いた場合には不可能な温度域での組換えタンパク質等の物質生産を可能にすることが期待され、かかる目的で誘導型発現ベクターの開発がなされている（既出願、田村；平成 14 年 8 月 12 日出願）。

しかしながら、ロドコッカス属の微生物は他のグラム陽性菌と比べて細胞壁の構造が特殊で強固であるため、該微生物からの細胞内容物の抽出は大腸菌等と比べて煩雑かつ困難である。すなわち、ロドコッカス属微生物は、微生物を溶菌するために一般的に用いられるリゾチームなどの細胞壁溶解酵素に対して極めて強い抵抗性を有しているため、その溶菌方法として、高濃度のペニシリン等の抗生剤に一定時間接触させることで細胞壁を弱めた上でリゾチームによる溶菌処理を行うという方法や、長時間に及ぶ超音波処理によって物理的に菌体を破碎する方法がとられている。このような方法では、処理が煩雑になることに加えて、大量の菌体の処理が困難であること、検体間での処理に差が出やすいこと等産業利用を図る上で大きな問題点がある。また、ペニシリン等の抗生剤は細胞壁の新規の合成を阻害することでその効果をもたらすものであり、合成が完了した細胞壁に対しては何ら影響を及ぼさない。従って、低温下等に見られるような急速な増殖が期待されない状況ではその効果は著しく低下するものと考えられる。

なお、ロドコッカス属に見られる細胞壁の構造はコリネ型細菌にも共通のものであることが知られており（C. E. Barry III et al., Prog. Lipid Res. 37, 143-179 (1988)）、形質転換等の分子生物学的操作を容易にする目的において本発明と類似の発明がなされている（特公平 01-003475, T. Hirasawa et al., J. Bacteriol. 182, 2696-2701 (2000)）。

発明の開示

本発明は、リゾチームに対する感受性が高まり、低濃度のリゾチームで容易に溶菌し得るロドコッカス属微生物であって、外来遺伝子を組込んで発現させた後に、リゾチーム処理を行うことにより容易に該タンパク質を回収することのでき

るロドコッカス属微生物の提供を目的とする。また、本発明は、前記リゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物を用いて外来タンパク質を産生させる方法を提供する。

本発明者らは細胞内容物の抽出処理が困難であるという点を克服しロドコッカス属微生物を用いた組換えタンパク質の発現系を完成させることを目的とし、野生型株と比べて極めて低濃度のリゾチームに対して感受性を有するロドコッカス属新規微生物を見出した。具体的には野生型株に対して突然変異の誘発を行い、リゾチーム含有培地で生育できない変異株を取得した。突然変異誘発の方法としては一般にニトロソグアニジン等の化学変異剤を用いる方法や放射線を照射する方法等がとられるが、本発明では安全性、簡便性といった点を考慮し紫外線照射による方法をとった。さらに、本発明者らは該微生物を用いることにより、ペニシリン等による前処理なしに、リゾチーム処理のみによる溶菌が可能となり、その結果菌体内に蓄積された組換えタンパク質等細胞内容物の抽出が従来の方法に比べて極めて簡便に行えることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物、
- (2) ロドコッカス属微生物がロドコッカス・エリスロポリスである(1)のロドコッカス属微生物、
- (3) ロドコッカス・エリスロポリスがロドコッカス・エリスロポリス L-65 (2002 年 6 月 12 日付(原寄託)で独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)に、受託番号 FERM BP-8443 として寄託されている)またはロドコッカス・エリスロポリス L-88 (2002 年 6 月 12 日付(原寄託)で独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)に、受託番号 FERM BP-8444 として寄託されている)である(2)のロドコッカス属微生物、
- (4) 野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物を外来タンパク質をコードする遺伝子を用いて形質転換し、該遺伝子を発現させ、前記ロドコッカス属微生物をリゾチームで処理して、前記タンパク質を抽出回収することを含む、タンパク質を産生する方法、

(5) ロドコッカス属微生物がロドコッカス・エリスロポリスである (4) のタンパク質を産生する方法、および

(6) ロドコッカス・エリスロポリスがロドコッカス・エリスロポリス L-65 (受託番号 FERM BP-8443) またはロドコッカス・エリスロポリス L-88 (受託番号 FERM BP-8444) である (5) のタンパク質を産生する方法、である

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明のロドコッカス属微生物は、野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物である。本発明のロドコッカス属微生物は、特定の種に限られず、ロドコッカス・エリスロポリス (R. erythropolis)、ロドコッカス・ファシアンス (R. fascians)、ロドコッカス・オパカス (R. opacus) 等が挙げられる。野生型ロドコッカス微生物とは、ロドコッカス属に属する遺伝的に変異をしていない微生物をいい、例えばロドコッカス・エリスロポリス JCM3201 が挙げられる。すなわち、本発明のリゾチームに感受性が高いロドコッカス属微生物は、野生型のロドコッカス属微生物を親株として変異誘導し得た変異体であって、親株に比べリゾチーム感受性が高くなっている変異リゾチーム属微生物である。リゾチームに対する感受性が高いとは、低いリゾチーム濃度で溶菌し得ることをいう。微生物を培養している培地にリゾチームを添加した場合に生育が阻止されるとき、その微生物はリゾチームに対する感受性を有するという。例えば、微生物の生育を阻止できる最小濃度のリゾチーム濃度 (最小生育阻止リゾチーム濃度) によりリゾチームに対する感受性を表すことができる。リゾチームの由来も限られず、例えば卵白リゾチームが挙げられる。最小生育阻止リゾチーム濃度は、例えばロドコッカス属微生物を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/ $10 \mu\text{l}$ に培地で調製し、該調製液 $10 \mu\text{l}$ に、リゾチームを数百 $\mu\text{g/ml}$ から数 $\mu\text{g/ml}$ 含むように段階希釈した培地に添加し、数日間培養し、ロドコッカス属微生物の生育を阻止するリゾチーム濃度により表すことができる。また、一定濃度のロドコッカス属微生物にリゾチームを添加し、培養を続け吸光度の変化を測定することによってもリゾチーム感受性の程度を決定することができる。この場合、リゾチーム非感受性株はリゾチームによっても溶菌せず増殖を続けるので経時的に吸光度は上昇していくが、リゾチーム感受性株は、リゾチームにより溶菌していくので吸光度は急激に減少する。

本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物の最小生育阻止リゾチーム濃度は、 $50\mu\text{g/ml}$ 以下、好ましくは $25\mu\text{g/ml}$ 以下、特に好ましくは $13\mu\text{g/ml}$ 以下である。これは、野生株すなわち親株の最小生育阻止リゾチーム濃度の 8 分の 1 以下、好ましくは 16 分の 1 以下、特に好ましくは 30 分の 1 以下である。

通常ロドコッカス属微生物はリゾチームに対する抵抗性が高くリゾチーム単独では、微生物体を溶菌することができず、高濃度のペニシリン等の抗生剤を用いて、増殖している微生物の細胞壁合成を阻害し、微生物の細胞壁を弱めた上でリゾチームを作用させる必要があるが、本発明のロドコッカス属微生物は、リゾチーム単独の処理により溶菌させることができる。

本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物は、野生型のロドコッカス属微生物、例えばロドコッカス・エリスロポリス JCM3201 を化学的変異原または物理的変異原で処理し、寒天培地上で培養し、生育したコロニーをリゾチームを含有する培地とリゾチームで含有しない培地で培養し、リゾチームを含有する培地で生育しない菌を選択することにより得ることができる。リゾチームに対する感受性は上述の感受性試験法により測定することができる。化学的変異原としては、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、マスタードガス等のアルキル化剤、ヒドラジン、亜硝酸等の非アルキル化剤、5-プロモウラシル、2-アミノプテリン等の DNA 塩基のアナログ、アクリジンオレンジ等の DNA 挿入剤が挙げられ、物理的変異原としては、紫外線、X 線、 γ 線、中性子線等が挙げられる。変異原による微生物の処理方法、用いる化学的変異原の濃度、用いる物理的変異原の強度等は公知の方法に従って、適宜選択すればよい。

本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物の例として、ロドコッカス・エリスロポリス L-6 5 菌株 (受託番号 FERM BP-8443) およびロドコッカス・エリスロポリス L-8 8 菌株 (受託番号 FERM BP-8444) が挙げられる。

本発明のリゾチームに対する感受性の高いロドコッカス属微生物は、リゾチームに対する感受性が野生株すなわち親株に比較して高くなっているが、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、チオストレプトン等の抗生剤の少なくとも 1 種以上に対する感受性は野生株と比較して同等で有意の差はないか、あるいはあったとしても野生株と比較してリゾチーム感受性は

どの差はない。すなわち、本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物を特定の抗生剤耐性遺伝子を選択マーカーとして組込んであり、外来遺伝子を組込んだ発現ベクターを用いて形質転換し、該形質転換体を選択マーカーに基づいて選択しようとした場合、形質転換されていないロドコッカス属微生物は該抗生剤に対する感受性が低下していないので生育できず、形質転換体のみを選択することができる。この点で、本発明のリゾチームに対する感受性の高いロドコッカス属微生物は、選択に用いようとする抗生剤に対する感受性が低下していなければよく、他の抗生剤に対する感受性が低下していてもよい。

本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物を用いて、組換えタンパク質を効率的に得ることができる。すなわち、本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物を他の生物種に由来する外来タンパク質をコードする遺伝子で形質転換し、該形質転換ロドコッカス微生物を該遺伝子を発現しうる条件で培養することにより前記外来タンパク質を発現させ、ついで発現タンパク質を微生物体内に保持している微生物をリゾチームで処理することにより、該タンパク質が抽出され、抽出液から該タンパク質を容易に精製し回収することができる。本発明のロドコッカス属微生物の形質転換は公知の方法により行えばよい。この際、本発明のリゾチームに対する感受性の低下したロドコッカス属微生物の形質転換効率は、野生株すなわち親株と比較して同等かあるいは、大きな差はない。変異誘導の影響で多少形質転換効率が低下することもあるが、外来タンパク質の発現産生の効率を大きく低下させるような低下は認められない。

形質転換は、例えば公知のロドコッカス属微生物用発現ベクターを用いることにより行うことができる。また、本発明者らが構築した、チオストレプトンで誘導発現が可能な発現ベクターpHN170を用いて行うことができる。

形質転換により外来遺伝子を組込んだロドコッカス属微生物を培養し、外来遺伝子を発現させた後に、微生物体を遠心分離等により集め、リゾチームを溶解させたリン酸緩衝液等の緩衝液中に懸濁させ、リゾチームの至適温度付近の温度で数十分から数時間インキュベーションを行う。微生物体はリゾチームの作用により溶菌し、発現したタンパク質が緩衝液中に抽出される。抽出されたタンパク質を公知のタンパク質精製法で精製することにより該タンパク質を得ることができる。溶菌の際に用いるリゾチームの濃度は、0.1mg/ml～10mg/ml、好ましくは約1

mg/ml である。精製は、各種の分離精製方法により行うことができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。この際、発現産物が GST、His tag 等との融合タンパク質として発現される場合は、目的タンパク質と融合しているペプチドまたはタンパク質の性質を利用して精製することもできる。例えば、GST はグルタチオンに対して親和性を有するので、グルタチオンを担体に結合させたカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより効率的に精製することができる。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-239554 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、段階希釈した培養液を LB 寒天培地に滴下し生育状態を比較した写真である。

図 2 は、ロドコッカス・エリスロポリス L-65 の増殖曲線を示した図である。

図 3 は、ロドコッカス・エリスロポリス L-88 の増殖曲線を示した図である。

図 4 は、ロドコッカス・エリスロポリス JCM3201 の増殖曲線を示した図である。

図 5 は、PIP タンパク質をロドコッカス・エリスロポリス L-65、L-88 および JCM3201 で発現させた場合の SDS ポリアクリルアミド電気泳動の図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

〔実施例 1〕

リゾチーム感受性菌株の製造

ロドコッカス・エリスロポリス JCM3201 を LB 培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、1% 塩化ナトリウム) で 30℃ にて振とう培養した。対数増殖期中期に適宜

希釈し1枚当たり約 5×10^5 細胞相当の菌体を1.5%寒天を含むLB培地上に塗布し、紫外線照射装置（アトー社製、出力4W）を用いて波長254nmの紫外線を塗布面に対し15cm離して20秒間照射した。紫外線照射を行った培地を30℃で2日間静置培養すると、1枚当たり約 5×10^5 個のコロニーが形成された。コロニーを楊子でかき取り約150 μ lのLB培地で満たした96穴プレートに接種し、よく懸濁した後、一部を50 μ g/mlの卵白由来リゾチーム（シグマ社製、以下単にリゾチームと表記）を含む約150 μ lのLB培地で満たした96穴プレートに接種した。これら1対のプレートを30℃にて2日間静置培養し、リゾチームを含まないLB培地でのみ生育可能な変異株をリゾチーム感受性株として取得した。本発明に係るリゾチーム感受性新規微生物としてロドコッカス・エリスロポリスL-65菌株およびロドコッカス・エリスロポリスL-88菌株が挙げられる。これらの菌株は2002年6月12日付（原寄託）で独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、受託番号FERM BP-8443およびFERM BP-8444としてそれぞれ寄託されている（2003年7月28日付で、原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求受領）。該菌株をLB培地に接種し、30℃にて振とう培養を行い対数増殖期中期の培養液の一部を新たなLB培地10 μ l中に約 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 細胞が含まれるように希釈し、50、25、12.5および6.3 μ g/mlのリゾチームを含有するLB寒天培地上にそれぞれ滴下した。この培地を30℃にて2日間培養した後、菌体の生育の有無を確認することで最小生育阻止濃度を決定した（表1および図1）。図に示すごとく、リゾチームを含まないLB寒天培地およびリゾチーム12.5 μ g/ml含有LB寒天培地にJCM3201、L-65およびL-88を滴下培養した。滴下した菌株は上段がJCM3201、中段がL-65、下段がL-88であり、培養液中の菌体数は左から、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 である。

表 1

菌株	寄託番号	最小生育阻止リゾチーム濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
ロドコッカス・エリスロポリス L-65	FERM BP-8443	12.5
ロドコッカス・エリスロポリス L-88	FERM BP-8444	12.5
ロドコッカス・エリスロポリス JCM3201	ATCC 25544	>400

〔実施例 2〕

ロドコッカス・エリスロポリス L-65 培養液へのリゾチーム添加による濁度の変化

100 ml の LB 培地にロドコッカス・エリスロポリス L-65 を植え 30℃ にて振とう培養し、対数増殖期の初期から 1 時間ごとに吸収波長 600 nm での培養液の吸光度 (OD_{600}) を測定した。 OD_{600} が 0.2 前後に達した時点で半量ずつ 2 本に分け、一方はそのまま、もう一方は終濃度 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームを添加しそれぞれさらに培養を続けながら吸光度の測定を行った。この結果を図 2 に示した。ロドコッカス・エリスロポリス L-65 の培養液に 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームを添加した場合と添加しない場合の増殖の様子を 600 nm の吸光度で示した。 OD_{600} がおよそ 0.2 になった時点でリゾチームを添加した (矢印で図示)。リゾチームを添加した場合には吸光度が急激に低下することが観察された。これはリゾチームによって溶菌が起きたためと考えられる。

〔実施例 3〕

ロドコッカス・エリスロポリス L-88 培養液へのリゾチーム添加による濁度の変化

実施例 2 と同一の操作をロドコッカス・エリスロポリス L-88 で行った場合の吸光度の測定結果を図 3 に示した。ロドコッカス・エリスロポリス L-88 の培養液に 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームを添加した場合と添加しない場合の増殖の

様子を600nmの吸光度で示した。OD₆₀₀がおよそ0.2になった時点でリゾチームを添加した(矢印で図示)。リゾチームを添加した場合には吸光度が急激に低下することが観察された。これはリゾチームによって溶菌が起きたためと考えられる。

〔比較例1〕

ロドコッカス・エリスロポリスJCM3201培養液へのリゾチーム添加による濁度の変化

実施例2と同一の操作をロドコッカス・エリスロポリスJCM3201で行った場合の吸光度の測定結果を図4に示した。ロドコッカス・エリスロポリスJCM3201の培養液に12.5μg/mlのリゾチームを添加した場合と添加しない場合の増殖の様子を600nmの吸光度で示した。OD₆₀₀がおよそ0.2になった時点でリゾチームを添加した(矢印で図示)。リゾチームの添加の有無に関わらず増殖の傾向は変わらないことが観察された。

〔実施例4〕

リゾチーム感受性菌株のアンピシリンに対する感受性

ロドコッカス・エリスロポリスL-65およびロドコッカス・エリスロポリスL-88のアンピシリンに対する感受性を実施例1と同様の方法により決定した。即ち、該菌株をLB培地に接種し、30℃にて振とう培養を行い対数増殖期中期の培養液の一部を新たなLB培地10μl中に約 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 細胞が含まれるように希釈し、15、10、1および0.1μg/mlのリゾチームを含有するLB寒天培地上にそれぞれ滴下した。この培地を30℃にて2日間培養した後、菌体の生育の有無を確認することで最小生育阻止濃度を決定した(表2)。同様にカナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンおよびチオストレプトンに対する感受性の比較も行ったが、野生株と変異株の間で有意な差は認められなかった。

表 2

菌株	寄託番号	最小生育阻止アンピシリン濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
ロドコッカス・エリスロポリス L-65	F E R M B P - 8 4 4 3	1
ロドコッカス・エリスロポリス L-88	F E R M B P - 8 4 4 4	1
ロドコッカス・エリスロポリス J C M 3 2 0 1	A T C C 2 5 5 4 4	15

〔実施例 5〕

リゾチーム感受性菌株の形質転換効率

ロドコッカス・エリスロポリスの形質転換はエレクトロポレーション法によった。以下にその詳細を述べる。ロドコッカス・エリスロポリス J C M 3 2 0 1、ロドコッカス・エリスロポリス L-65 およびロドコッカス・エリスロポリス L-88 株をそれぞれ L B 培地 100 ml にて対数増殖期に至るまで 30℃ で振とう培養した。培養液を 30 分間氷冷し、遠心分離し、菌体を回収した。これに 100 ml の氷冷滅菌水を加え、よく攪拌し、再び遠心分離し、菌体を回収した。これに 100 ml の氷冷 10% グリセリン溶液を加え、よく攪拌し、遠心分離し、菌体を回収した。この氷冷 10% グリセリン溶液での洗浄をもう一度繰り返し、菌体を 5 ml の氷冷 10% グリセリン溶液に懸濁し、この菌体 400 μl とロドコッカス・エリスロポリスでの自立複製が可能なプラスミド DNA (p H N 1 4 4 : 中島、田村、全長配列を配列番号 1 に示した) の混合液をエレクトロポレーションキュベット (B i o - R a d 社 : 0.2 cm ギャップキュベット) に移し、同社の遺伝子導入装置ジーンパルサー I I を用いて、電場強度 12.5 kV/cm で、パルスコントローラーの設定はキャパシタンス 25 μF 、外部抵抗 400 Ω にてそれぞれ電気パルスを与えた。電気パルス処理した菌体と DNA の混合液を 1 ml の L B 培地に混合し、30℃ にて 4 時間培養した後集菌し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ チオストレプトン含有 L B 寒天培地に塗布し、30℃ にて 3 日培養し、それ

ぞれの形質転換体を得た。このときのDNA 1 μ gあたりの形質転換効率（コロニー形成数）を表3に示した。

表3

菌株	寄託番号	形質転換効率
ロドコッカス・エリスロポリスL-65	FERM BP-8443	2.6×10^5
ロドコッカス・エリスロポリスL-88	FERM BP-8444	2.5×10^5
ロドコッカス・エリスロポリスJCM3201	ATCC 25544	4.0×10^5

〔実施例6〕

ロドコッカス・エリスロポリスL-65株を用いた組換えタンパク質の抽出

ロドコッカス・エリスロポリス菌体内で自立複製可能で、かつチオストレプトンによる誘導によりC末側6×ヒスチジンタグをもつプロリンイミノペプチダーゼ（以下PIPと表記）タンパク質（T. Tamura et al., FEBS Lett. 398, 101-105 (1996)）を発現すべく構築されたプラスミド（pHN170：中島、田村、全長配列を配列番号2に示した）をロドコッカス・エリスロポリスL-65株にエレクトロポレーション法により導入し、テトラサイクリン（20 μ g/ml）含有LB寒天培地上で形質転換体を選別した。形質転換体をテトラサイクリン（8 μ g/ml）含有LB培地4mlに植え、吸収波長600nmでの培養液の吸光度が0.8に達するまで30℃にて振とう培養した。この全量をチオストレプトン（1 μ g/ml）含有LB培地40mlに加え、羽根付きフラスコで16時間旋回培養しPIPタンパク質の発現を誘導した後、1,500×g、15分間の遠心操作で集菌した。菌体を300mM食塩含有50mMリン酸緩衝液（pH8.0）4mlに懸濁後リゾチームを終濃度1mg/mlとなるように添加した。37℃で1時間インキュベーションした後、氷上にて冷却し10,000×g、15分間の遠心操作を行い上清（s）と沈殿（p）に分離した。得られた上清（s）のうち1mlを別の微量遠心チューブにとりわけ、あらかじめ300mM食塩含

有50mMリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化しておいたNi-NTA Superflow (QIAGEN社製) 50 μ lを添加し、上下反転しながら4℃にて1時間インキュベーションした。300mM食塩および10%グリセリン含有50mMリン酸緩衝液(pH6.0) 1mlで、3回洗浄した後500mM EDTA、300mM食塩および10%グリセリン含有50mMリン酸緩衝液(pH6.0) 50 μ lで6×ヒスチジン融合PIPタンパク質を溶出した。このうち10 μ lをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ6×ヒスチジン融合PIPタンパク質のアミノ酸配列から予想される分子量(34.3KDa)付近に明瞭なバンドが検出された(図5)。一方で、得られた沈殿(p)は8M尿素含有100mMリン酸2水素ナトリウム-10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 1mlに再懸濁し30分間放置した後、10,000 \times g、15分間の遠心操作を行い上清を新たな微量遠心チューブに移し、あらかじめ8M尿素含有100mMリン酸2水素ナトリウム-10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で平衡化しておいたNi-NTA Superflow 50 μ lを添加し、上下反転しながら室温にて1時間インキュベーションした。8M尿素含有100mMリン酸2水素ナトリウム-10mMトリス塩酸緩衝液(pH6.3) 1mlで3回洗浄した後500mM EDTAおよび8M尿素含有100mMリン酸2水素ナトリウム-10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 50 μ lで6×ヒスチジン融合PIPタンパク質を溶出した。このうち10 μ lをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した(図5)。Mは分子量マーカーであり各バンドのおよその分子量を図左に示した。図5中、各レーンは以下のバンドパターンを示した。

レーン1(JCM3201, s); JCM3201株でPIPを発現させた場合の上清から得られた試料を泳動したもの。未変性条件緩衝液(尿素を含まない)中ではほとんど溶菌しないので目的のバンド(矢印で図示)は検出されない。レーン2(JCM3201, p); JCM3201株でPIPを発現させた場合の沈殿から得られた試料を泳動したもの。変性条件緩衝液(尿素を含む)中でわずかに溶菌し、目的のバンドが薄く確認される。

レーン3(JCM3201+amp, s); JCM3201株でPIPを発現させた場合の上清から得られた試料を泳動したもの。ただし、ここでは集菌直前の2時間に渡ってアンピシリンによる処理を施してある。アンピシリンによってリ

ゾチームに対する感受性が高まり、未変性条件緩衝液中でも溶菌が起こり目的のバンドが十分確認できる。

レーン4 (JCM3201 + amp, p); JCM3201株でPIPを発現させた場合の沈殿から得られた試料を泳動したもの。ただし、ここでは集菌直前の2時間に渡ってアンピシリンによる処理を施してある。アンピシリンで前処理をしてもなお未変性条件緩衝液中では溶菌されなかった菌体が、変性条件緩衝液中で溶菌し、目的のバンドが検出されたと考えられる。

レーン5 (L-65, s); L-65株でPIPを発現させた場合の上清から得られた試料を泳動したもの。リゾチーム処理によって完全に溶菌し、目的のバンドが検出される。

レーン6 (L-65, p); L-65株でPIPを発現させた場合の沈殿から得られた試料を泳動したもの。沈殿には溶菌後の細胞残滓のみが含まれると考えられ目的のバンドは検出されない。

レーン7 (L-88, s); L-88株でPIPを発現させた場合の上清から得られた試料を泳動したもの。L-65株の場合と同様のことが考えられる。

レーン8 (L-88, p); L-88株でPIPを発現させた場合の沈殿から得られた試料を泳動したもの。L-65株の場合と同様のことが考えられる。

なお、上記操作で用いた抗生剤は、5mgテトラサイクリンを1mlの50重量%エタノールに溶解したもの、または10mgチオストレプトンを1mlのジメチルスルホキシドに溶解したものを必要量使用した。

〔実施例7〕

ロドコッカス・エリスロポリスL-88株を用いた組換えタンパク質の抽出

実施例6と同一の操作をロドコッカス・エリスロポリスL-65株に代えてロドコッカス・エリスロポリスL-88株を用いて行った (図5)。

〔比較例2〕

ロドコッカス・エリスロポリスJCM3201株を用いた組換えタンパク質の抽出

実施例6と同一の操作をロドコッカス・エリスロポリスL-65株に代えてロドコッカス・エリスロポリスJCM3201株を用いて行った (図5)。

〔比較例3〕

ロドコッカス・エリスロポリス JCM 3201 株を用いた組換えタンパク質の抽出

ロドコッカス・エリスロポリス L-65 株に代えてロドコッカス・エリスロポリス JCM 3201 株を用いて実施例 6 のごとく形質転換体を作製し、チオストレプトンによる PIP タンパク質の発現誘導を行った。集菌を行う 2 時間前に 50 mg/ml アンピシリン水溶液 480 μ l を添加し（終濃度 600 μ g/ml）、集菌以下実施例 6 と同様の操作を行い得られた試料を電気泳動に供した（図 5）。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

実施例に示すように、本発明のロドコッカス属微生物はリゾチームに対する感受性が野生株に比べ高くなっている。また、形質転換効率は野生株と比べて大きく変わっていない。従って、本発明のロドコッカス属微生物を外来タンパク質をコードする遺伝子で効率的に形質転換し、該タンパク質を発現させた後に、リゾチームで溶菌させることにより容易に該タンパク質を抽出し、回収することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 : プラスミド pHN144

配列番号 2 : プラスミド pHN170

請求の範囲

1. 野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物。
2. ロドコッカス属微生物がロドコッカス・エリスロポリスである請求項1記載のロドコッカス属微生物。
3. ロドコッカス・エリスロポリスがロドコッカス・エリスロポリス L-65 (受託番号 FERM BP-8443) またはロドコッカス・エリスロポリス L-88 (受託番号 FERM BP-8444) である請求項2記載のロドコッカス属微生物。
4. 野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物を外来タンパク質をコードする遺伝子を用いて形質転換し、該遺伝子を発現させ、前記ロドコッカス属微生物をリゾチームで処理して、前記タンパク質を抽出回収することを含む、タンパク質を産生する方法。
5. ロドコッカス属微生物がロドコッカス・エリスロポリスである請求項4記載のタンパク質を産生する方法。
6. ロドコッカス・エリスロポリスがロドコッカス・エリスロポリス L-65 (受託番号 FERM BP-8443) またはロドコッカス・エリスロポリス L-88 (受託番号 FERM BP-8444) である請求項5記載のタンパク質を産生する方法。

図 1

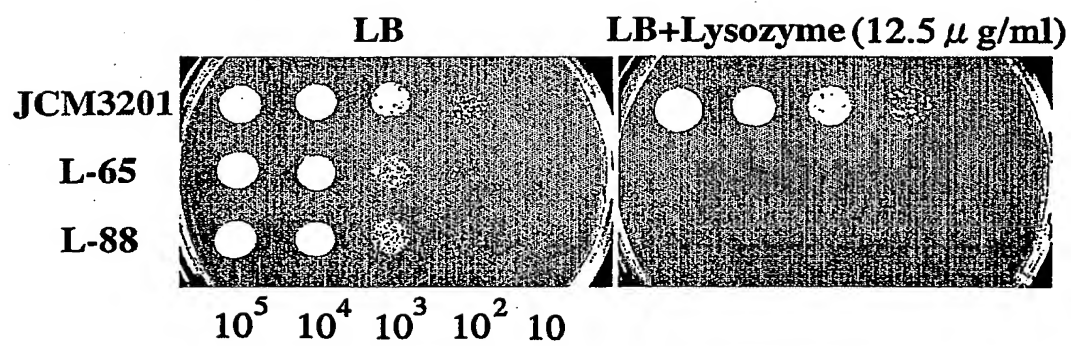


図 2

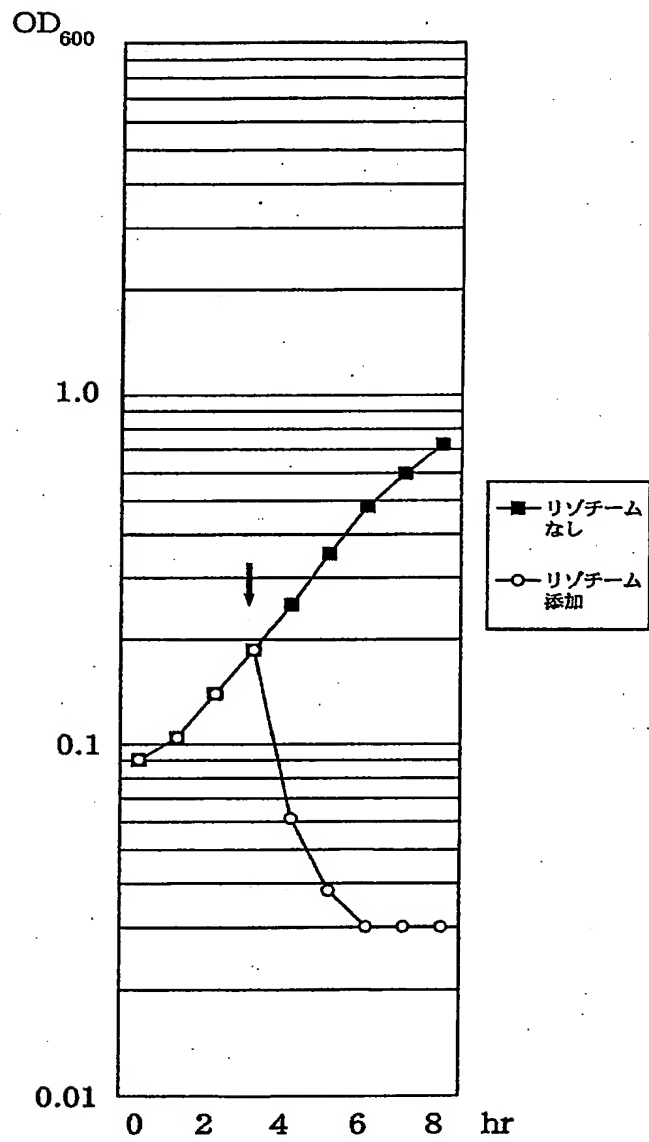
Rhodococcus erythropolis L-65

図 3

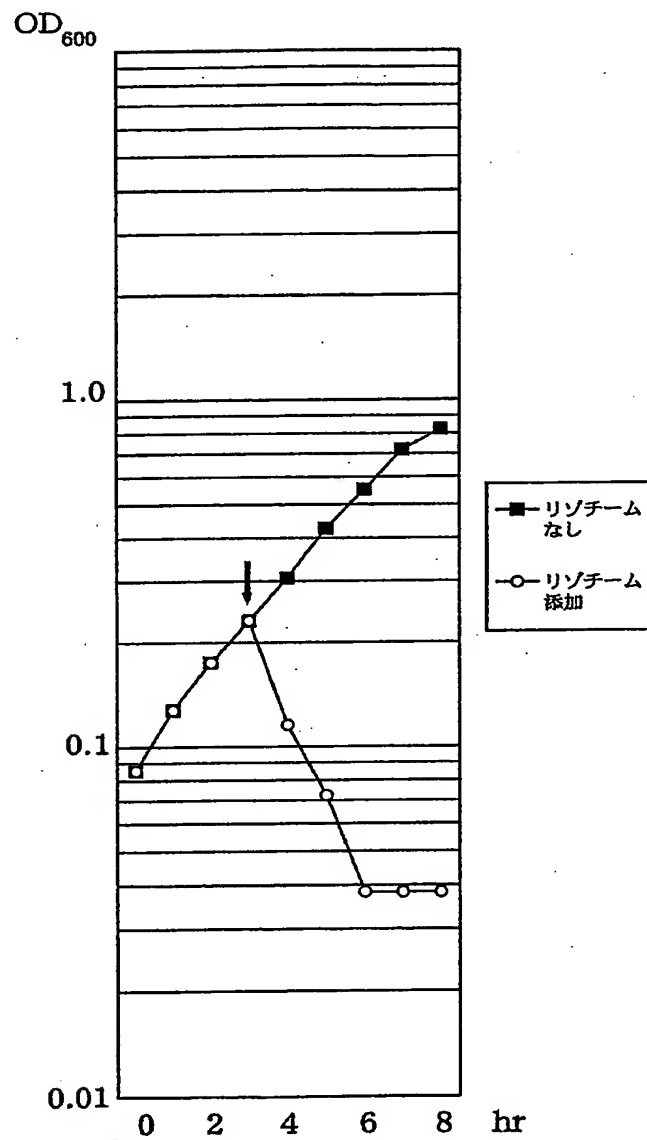
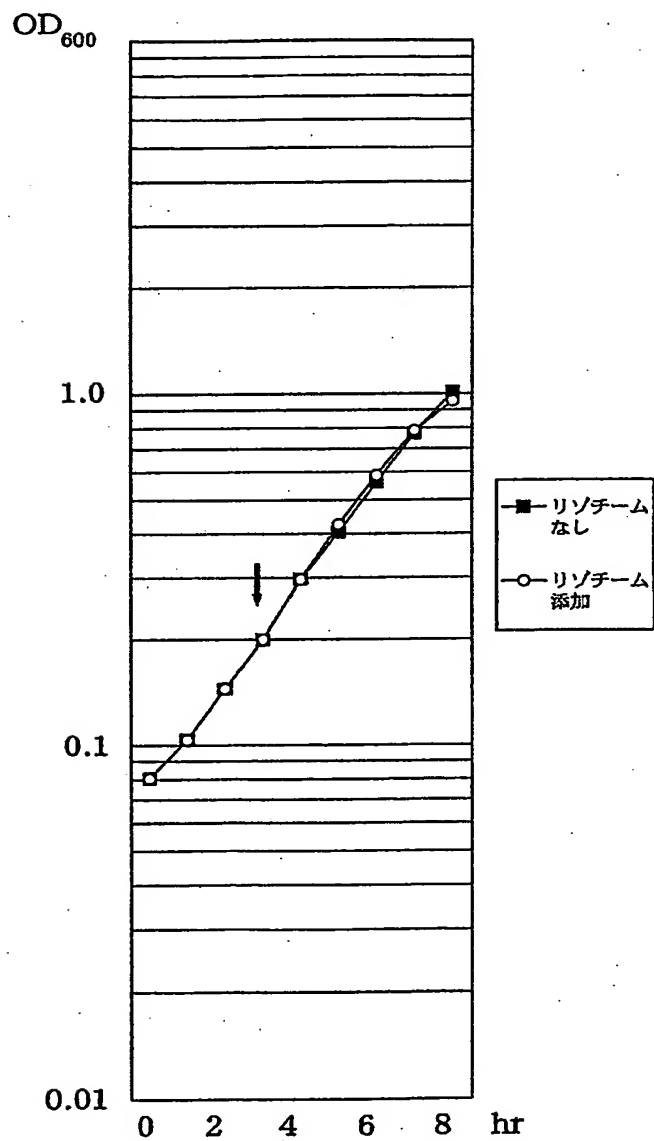
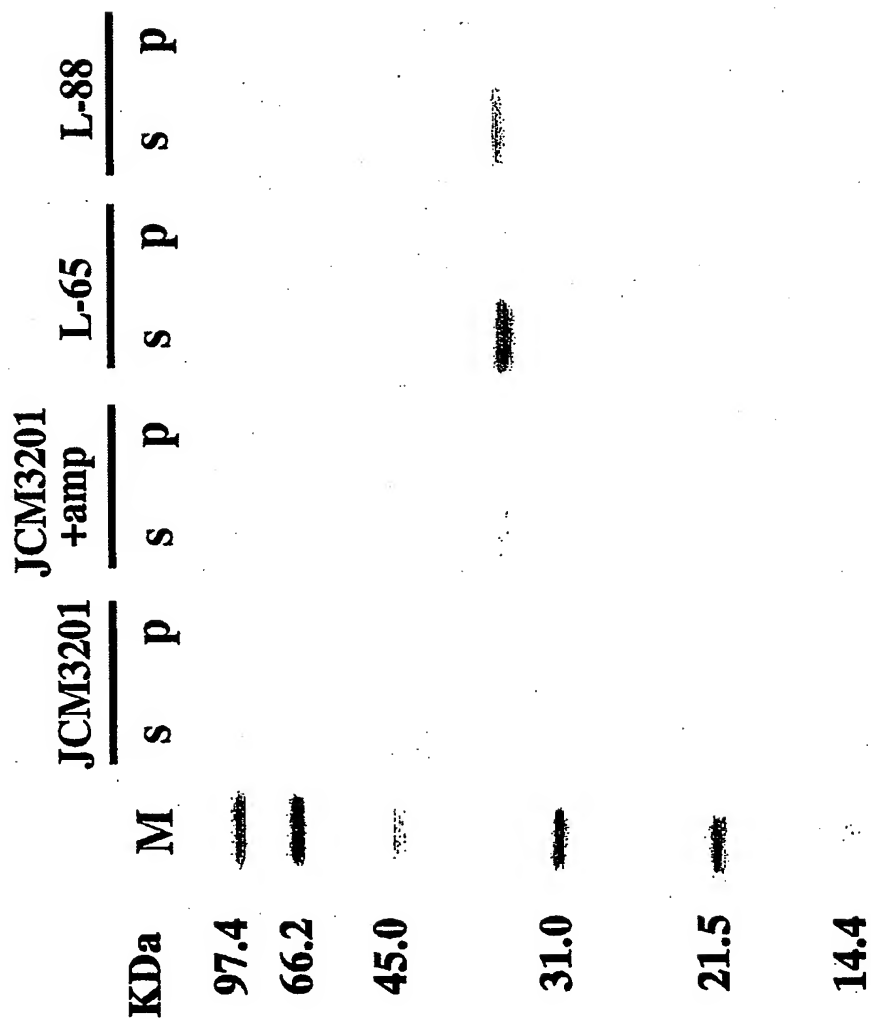
Rhodococcus erythropolis L-88

図 4

Rhodococcus erythropolis JCM3201

5



SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> A novel lysozyme sensitive microorganism

<130> PH-1850-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2002/239554

<151> 2002-08-20

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pHN144

<400> 1

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttcccccttg cgttggatgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120

tcacacccca ggaatcggt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccca tgcacagcat 300
cgcgccggg gtggagtca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatciga 360
gttgctggat ctgtcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaagggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagt acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaaggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggtcggc ctgtctgttc ggcagcgaaa agggcggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttcgc ctcggttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cagcagagga tcgacaggaa 960
tctcgcgcc aaccgataag cgctctgtt cctcgagcgc tcggttctc gacctgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cagggcagcg atcaccactg acatcagag gtcaacggtc 1080
gtggcggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgagcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagaggatcc ccgggtaccg agctcgtcag gtggcacttt tcgggaaat gtgcgaggaa 1200
cccctatttg tttattttt taaatacatt caaataatga tccgctcatg agacaataac 1260
cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 1320
tcgcccttat tcccttttt gcggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc 1380
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 1440
atctcaacag cggtagatc cttgagagt ttcccccga agaacgtttt ccaatgatga 1500
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 1560
aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag 1620
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga 1680
gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 1740
cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga 1800
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt 1860

tgcgcaaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 1920
ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt 1980
ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg 2040
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 2100
tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag catttgtaac 2160
tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 2220
aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 2280
tttcgttcca ctgagcgta gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 2340
tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 2400
glttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 2460
agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 2520
tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tccgtttacc agtggctgct gccagtggcg 2580
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcgg 2640
cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc tacaccgaac 2700
tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 2760
acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg caccagggag cttccagggg 2820
gaaacgcctg gtatctttat agtccgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 2880
ttttgtgatg ctgcgcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 2940
tacggttcct ggccctttgc tggccttttg ctacatgtt ctttctgcg ttatcccctg 3000
attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcg cgcagccgaa 3060
cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgccaata cgcaaaccgc 3120
ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgactagttg tacaccgag 3180
aagctcccag cgtcctcctg ggccgcgata ctgcaccacc acgcacgcac accgcactaa 3240
cgattcggcc ggcgctcgat tcggccggcg ctcgattcgg ccggcgctcg attcgccgg 3300
cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc gagcagaaga gtgaacaacc accgaccag 3360
cttccgctct gcgcgccgta cccgacctac ctcccgcagc tcgaagcagc tcccgggagt 3420
accgccgtac tcaccgcct gtgctacca tccaccgacg caaagcccaa cccgagcaca 3480
cctcttgca caaggtgccg accgtggctt tccgctcgca gggttcaga agaaatcgaa 3540
cgatccagcg cggcaaggtt caaaaagcag gggttggtgg ggaggaggtt ttggggggtg 3600

tcgccgggat acctgatatg gctttgtttt gcgtagtcga ataattttcc atatagcctc 3660
 ggcgcgctcg actcgaatag ttgatgtggg cgggcacagt tgcccatga aatccgcaac 3720
 ggggggcgtg ctgagcgatc ggcaatgggc ggatgcggtg ttgcttcgc accggccgtt 3780
 cgcgacgaac aacctccaac gaggtcagta ccgatgagc cgcgacgacg catttgcaat 3840
 gcggtacgtc gagcattcac cgcacgcgtt gctcggatct atcgatcgc actgcgatca 3900
 cgttgacgcc gcgatgcgcg cattcgagca accatccgac catccggcgc cgaactgggt 3960
 tgcacaatcg ccgtccggcc gcgcacacat cggatgggtg ctccggccca accacgtgtg 4020
 ccgcaccgac agcgcccgac tgacgccact gcgctacgcc caccgcatcg aaaccggcct 4080
 caagatcagc gtcggcggcg atttcgcgta tggcgggcaa ctgacaaaa acccgattca 4140
 ccccgattgg gagacgatct acggcccggc caccctac acattgcgc agctggccac 4200
 catccacaca cccggcgaga tgccgcgtcg gcccgatcgg gccgtgggc tggccgcaa 4260
 cgtcaccatg ttcgacgcca cccggcgatg ggcataccg cagtgggtgc aacaccgaaa 4320
 cggaaccggc cgcgactggg accatctcgt cctgcagcac tgccacgccg tcaacaccga 4380
 gttcacgaca ccaactgccgt tcaccgaagt acgcgccacc gcgcaatcca tctccaaatg 4440
 gatctggcgc aatttcaccg aagaacagta ccgagcccg caagcgcatc tcggtcaaaa 4500
 aggcggaag gcaacgacac tcgccaaca agaagccgtc cgaaacaatg caagaaagta 4560
 cgacgaacat acgatgcgag aggcgattat ctgatggcg gagccaaaaa tccggtgcgc 4620
 cgaaagatga cggcagcagc agcagccgaa aaattcgggt cctccactcg cacaatccaa 4680
 cgcttgtttg ctgagccgcg tgacgattac ctccggcgtg cgaaagctcg ccgtgacaaa 4740
 gctgtcgagc tgcggaagca ggggtgaag taccgggaaa tcgccgaagc gatggaactc 4800
 tcgaccggga tcgtcggccg attactgcac gacgcccgca ggcacggcga gatttcagcg 4860
 gaggatctgt cggcgtaacc aagtcagcgg gttgtcgggt tccggccggc gctcggcact 4920
 cggaccggcc ggcggatggt gtctgcctc tggcgacgc tcagctaccg ccgaaggcct 4980
 gtcacgacc ggcttcgact gaagtatgag caacgtcaca gcctgtgatt ggatgatccg 5040
 ctcacgctcg accgctacct gtacagctgc cggcgctgg gcatgagcaa cggccaactc 5100
 tcgttcaa 5108

<210> 2

<211> 8971

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pHN170

<400> 2

```
gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttcccccttg cgttggatgat tgccgggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120
tcacaccccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300
cgcgggccggg gtggagttca tcgagggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagt acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc ctgtctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atccccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cagcagagga tcgacaggaa 960
tctcggggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgcttttaggc ttgacccccg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
```

cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcaccggtt ctccggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cggccagtcc tgcctgcttc 1560
gctacttgga gccactatcg actacggat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcggtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttcttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860
cctaatacgag gattcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacc 1920
agtcagctcc ttcgggtggg cgcggggcat gactatcgct gccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacagggtgc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
cgccctcgct caagccttcg tcactggctc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttc ggcgcatcg ggatgccgcg 2280
gttgcaggcc atgtgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcg ccctatacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgttgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580
cggagaactg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcaac 2700
tagaattgat ctctcgacc gccaatggg catctgagaa tcatctgctt ttctcgacg 2760
caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc acaccacc ggggggtggg 2820
attgcagtca ccgatttggg gggtcgccc aggaagatca cgtttacata ggagcttgca 2880
atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttcgccggag tgacggtgcg cagctgcac 2940
cactacgacg acatcgccct gctcgtaccg agcgagcgca gccacgcggg ccaccggcg 3000
tacagcgacg ccgacctga ccggctgcag cagatcctgt tctaccggga gctgggcttc 3060

ccgctcgcagc aggtcgccgc cctgctcgac gacccggccg cggacccgcg cgcgcacctg 3120
cgccgccagc acgagctgct gtccgcccg atcgggaaac tgcagaagat ggccggcggcc 3180
gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc tcaccccgga ggagaagtgc 3240
gaggtcttcg gcgacttcga ccccgaccag tacgaggagg aggtccggga acgctggggg 3300
aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct cgtacaccaa ggaggactgg 3360
cagcgcatcc aggacgaggc cgacgagctc acccggcgct tcgtcgccct gatggacgcg 3420
ggtgagcccg ccgactccga gggggcgatg gacgcccgcc aggaccaccg gcagggcacg 3480
gcccgaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct gcctgggcga gatgtacgtg 3540
tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccgccaagc cgggcctcgc cgcctacatg 3600
cgcgacgcga tcctcgccaa cgccgtccgg cacacccctt gagcgggtgt cgtggcccg 3660
gtctcccgcc cgggtctacc ccacggctca ctccggggcc acgaccaccg ccgtcccgta 3720
cgcgcacacc tcggtgccc agtccgcgc ctccgtcagc tcgaaacgga agatcccg 3780
gtaccgagct cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta 3840
tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt 3900
caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc cttattccc 3960
tttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag aaacgctgtt gaaagtaaaa 4020
gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcgtt 4080
aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt 4140
ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgatatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc 4200
atacactatt ctgagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcattctacg 4260
gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg 4320
gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac 4380
atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca 4440
aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta 4500
actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat ggaggcggat 4560
aaagtgcag gaccacttct gcgctcgcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa 4620
tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag 4680
ccctcccgta tcgtagttaa ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat 4740
agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt 4800

tactcatata tacttttagat tgatttataaa cttcattttt aatttataaag gatctaggtg 4860
aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 4920
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 4980
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgitt gccggatcaa 5040
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 5100
gttcttctag ttagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 5160
tacctcgctc tgctaatact gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 5220
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 5280
ggttcgigca cacagcccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 5340
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaga aggcggacag gtatccgta 5400
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 5460
ctttatagtc ctgctgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 5520
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 5580
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 5640
cgtattaccg cctttgagt agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc 5700
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgct 5760
tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtccg ctgaggcggc gtagcaggtc 5820
agccgcccc gcggtggtca ccaaccgggg tggaacggcg ccggtatcgg gtgtgtccgt 5880
ggcgctcatt ccaacctccg tgtgtttgtg caggtttcgc gtgttgagc cctcgcacc 5940
ggcaccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga ctagtttatt aatgatgatg 6000
atgatgatgc aggtgtttca ggatgaaatc cgaaagcaac ttgttgatc cttcacgac 6060
ctccacatc gtgaggtgcg agcaatccct gaagacgtga agttccgaac cagctatttt 6120
ttcatgtatg actctggcca cgtttggcgt gacctatcg tattcgcca ccgttataag 6180
ggtggggatc tttattgcag atattttgtc cgtgatatcc cagtccttta tctgcccgt 6240
tatggtgaac tcattcgggc cgttcattat cctgtatagc tttcgctttt ccgcgtattc 6300
tagtgatttg agtacctcgg gcggccaatc ctctgatctc agcagatgct gatggtaaaa 6360
gtagttcacg gcctcctgat attctggatt ctcgtaagat ccagatgaac cgtatttttt 6420
aatggcatct ctgtactttg ccgggagctc gtcaatgagc ctgttcactt cttcaccgt 6480
cagagggact gaagataagc ctccggatac gatgagccct ttcagatgat cctggctact 6540

gactgcgtat gccagcgcca gcgctccacc atatgatgac cccatcaaaa ataccttctc 6600
gttgccgaac agctttgatc ttagggcctc tgcctcttcc acaccatagt caattgtgaa 6660
tttagactga tccggttcct cggatctacc gcatccaaac tgatcgtaga atagaaccgt 6720
tatecccttc ttggcataat ccctgagaga aagcaggtaa tcgtgggaca tgcccgggcc 6780
cccgtgcatg gtcattagct ttgctttctc ctcaggggct ttgcacagct tgtaataaat 6840
ataaattccg ttacctttg cgtagttttc tatgcattcc tgatccatgg ccgctccctt 6900
ctctgacgcc gtccacgctg cctcctcacc tgacgtgagg tgcaagcccg gacgttccgc 6960
gtgccacgcc gtgagccgcc gcgtgccgtc ggctccctca gcccgggcgg ccgtgggagc 7020
ccgcctcgat atgtacaccc gagaagctcc cagcgtcctc ctgggccgcg atactcgacc 7080
accacgcacg cacaccgcac taacgattcg gccggcgctc gattcgggcg gcgctcgatt 7140
cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg gccgagcaga 7200
agagtgaaca accaccgacc acgcttccgc tctgcgcgcc gtacccgacc tacctccgc 7260
agctcgaagc agtcccggg agtaccgccg tactcaccgg cctgtgtca ccatccaccg 7320
acgcaaagcc caaccggagc acacctcttg caccaagggtg ccgaccgtg ctttccgctc 7380
gcagggttcc agaagaaatc gaacgatcca gcgcggcaag gttcaaaaag caggggttgg 7440
tggggaggag gttttgggg gtgtcgccgg gatacctgat atggcttgt tttagcgtagt 7500
cgaataattt tccatatagc ctcggcgcgt cggactcgaa tagttgatgt gggcgggcac 7560
agttgcccc tgaaatccgc aacggggggc gtgctgagcg atcggcaatg ggcggatgcg 7620
gtgttgcttc cgcaccggcc gttcgcgacg aacaacctcc aacgaggta gtaccgatg 7680
agccgcgacg acgcattggc aatgcggtac gtcgagcatt caccgcacgc gttgctcgga 7740
tctatcgtca tcgactgca tcacgttgac gccgcgatgc gcgcattcga gcaaccatcc 7800
gaccatccgg cgccgaactg ggttgacaaa tcgccgtccg gccgcgcaca catcggatgg 7860
tggtcggcc ccaaccacgt gtgccgcacc gacagcgccc gactgacgcc actgcgctac 7920
gccaccgca tcgaaaccgg cctcaagatc agcgtcggcg gcgatttcgc gtatggcggg 7980
caactgacca aaaaccgat tcaccccgat tgggagacga tctacggccc ggccaccccg 8040
tacacattgc ggcagctggc caccatccac acaccccgcc agatgccgcg tgggcccgat 8100
cgggccgtgg gcctgggccc caacgtcacc atgttcgacg ccacccggcg atgggcatac 8160
ccgcagtggg ggcaacaccg aaacggaacc ggccgcgact gggaccatct cgtcctgcag 8220
cactgccacg ccgtcaacac cgagttcacg acaccactgc cgttcaccga agtacgcgcc 8280

accgcgcaat ccattctccaa atggatctgg cgcaatttca ccgaagaaca gtaccgagcc 8340
cgacaagcgc atctcgggtca aaaaggcggc aaggcaacga cactcgccaa acaagaagcc 8400
gtccgaaaca atgcaagaaa gtacgacgaa catacgatgc gagaggcgat tatctgatgg 8460
gcggagccaa aaatccggtg cgccgaaaga tgacggcagc agcagcagcc gaaaaattcg 8520
gtgcctccac tcgcacaatc caacgcttgt ttgctgagcc gcgtgacgat tacctcggcc 8580
gtgcgaaagc tcgccgtgac aaagctgtcg agctgcggaa gcaggggttg aagtaccggg 8640
aaatcgccga agcgatggaa ctctcgaccg ggatcgtcgg ccgattactg cagcagccc 8700
gcaggcacgg cgagatttca gcggaggatc tgtcggcgta accaagtcag cgggttgtcg 8760
ggttccggcc ggcgctcggc actcggaccg gccggcggat ggtgttctgc ctctggcgca 8820
gcgtcagcta ccgccgaagg cctgtcatcg accggcttcg actgaagtat gagcaacgtc 8880
acagcctgtg attggatgat ccgctcacgc tcgaccgcta cctgttcagc tgccgcccgc 8940
tgggcatgag caacggccaa ctctcgttca a 8971

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N1/20, C12N1/21, C12P21/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N1/20, C12N1/21, C12P21/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, JICST-Eplus		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 64680 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 17 November, 1982 (17.11.82), & JP 57-186489 A & JP 58-56678 A & CA 1185197 A & IL 65650 A & US 4681847 A & EP 64680 B & JP 1-3475 B	1-6
A	JP 61-280273 A (Seitetsu Kagaku Kogyo Co., Ltd.), 10 December, 1986 (10.12.86), (Family: none)	1-6
A	JP 7-255484 A (Japan Energy Corp.), 09 October, 1995 (09.10.95), (Family: none)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 08 September, 2003 (08.09.03)		Date of mailing of the international search report 24 September, 2003 (24.09.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10342

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAILEY, S.A. et al., Emulsification of crude oil by Rhodococcus erythropolis strain ST-2 via a cell-surface, lysozyme-sensitive glycoprotein., System.Appl.Microbiol., vol.20, pages 545 to 548, (1997)	1-6
A	INOUE, M. et al., Isolation and characterization of lysozyme-sensitive mutants of Staphylococcus aureus., J.Bacteriol., Vol.144(3), pages 1186 to 1189 (1980)	1-6
A	HIRASAWA, T. et al., A mutation in the Corynebacterium glutamicum ltsA gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production., J.Bacteriol., Vol.182(10), pages 2696 to 2701, (2000)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. 7 C12N 1/20, C12N 1/21, C12P 21/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. 7 C12N 1/20, C12N 1/21, C12P 21/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, JICST-Eplus		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 64680 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) 1982.11.17 & JP 57-186489 A & JP 58-56678 A & CA 1185197 A & IL 65650 A & US 4681847 A & EP 64680 B & JP 1-3475 B	1-6
A	JP 61-280273 A (製鉄化学工業株式会社) 1986.12.10 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 7-255484 A (株式会社ジャパンエナジー) 1995.10.09 (ファミリーなし)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	08.09.03	
国際調査報告の発送日	24.09.03	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)  4N 9123 長井 啓子 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BAILEY, S. A. et al., Emulsification of crude oil by <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain ST-2 via a cell-surface, lysozyme-sensitive glycoprotein. <i>System. Appl. Microbiol.</i> , vol. 20, pp. 545-548 (1997)	1-6
A	INOUE, M. et al., Isolation and characterization of lysozyme-sensitive mutants of <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>J. Bacteriol.</i> , vol. 144(3), pp. 1186-1189 (1980)	1-6
A	HIRASAWA, T. et al., A mutation in the <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>ltsA</i> gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. <i>J. Bacteriol.</i> , vol. 182(10), pp. 2696-2701 (2000)	1-6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BAILEY, S. A. et al., Emulsification of crude oil by <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain ST-2 via a cell-surface, lysozyme-sensitive glycoprotein. <i>System. Appl. Microbiol.</i> , vol. 20, pp. 545-548 (1997)	1-6
A	INOUE, M. et al., Isolation and characterization of lysozyme-sensitive mutants of <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>J. Bacteriol.</i> , vol. 144(3), pp. 1186-1189 (1980)	1-6
A	HIRASAWA, T. et al., A mutation in the <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>ltsA</i> gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. <i>J. Bacteriol.</i> , vol. 182(10), pp. 2696-2701 (2000)	1-6